

AZ ADENOZIN HATÁSA A PERIFÉRIÁS CD4⁺ T-LIMFOCITÁK AKTIVÁCIÓJÁRA

Doktori értekezés tézisei

Balicza-Himer Leonóra

Eötvös Loránd Tudományegyetem

Természettudományi Kar

Biológia Doktori Iskola / Immunológia Program



A Doktori Iskola és Program vezetője:
Prof. Dr. Erdős Anna, D.Sc.

Témavezető:
Dr. Haskó György, M.D., Ph.D.

Magyar Tudományos Akadémia
Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet

Budapest

2011

BEVEZETÉS

Az adenozin egy immunszuppresszív tulajdonságokkal rendelkező endogén purin nukleozid, mely hatást négy, G-protein kapcsolt receptorán, az A_1 , A_{2A} , A_{2B} és az A_3 receptorokon keresztül fejti ki, melyek az immunrendszer minden sejtjén megtalálhatók. A nyugvó T-limfociták mind a négy adenozin receptort kifejezik, azonban az eddigi tanulmányok mind a négy adenozin receptorok játszanak döntő szerepet a limfocita alapján az A_{2A} receptorok aktivációját és proliferációját. Ugyanakkor hiányos ismeretekkel rendelkezünk arra vonatkozólag, hogy az adenozin milyen szerepet játszhat a Th1 és Th2 sejtek fejlődésében, és hogyan hat a már polarizáltnak tekinthető effektor Th1 és Th2 sejtek aktivációjára.

Az előzőleg antigénnel vagy mitogénnel aktivált, proliferáló és érett T-sejtek hosszantartó vagy ismételt TCR stimulációja a Fas-FasL kapcsolódáshoz, ezáltal a sejtek aktiváció-indukált sejtihalához (AICD) vezet. A FasL-függő limfocita sejtihalá rendkívül fontos szerepet tölt be a perifériás tolerancia fenntartásában és a kontrollálatlan immunválasz kialakulásának megakadályozásában. Az adenozin és analógjai apoptotikus folyamatokat is szabályozhatnak, melyek fontos szerepet kapnak a T-limfociták és más sejtípusok fejlődésében és expansziójában. Vizsgálatainkat megelőzően azonban ismeretlen volt, hogy az A_{2A} receptorok milyen szerepet játszhatsanak az érett $CD4^+$ T-sejtek TCR által közvetített, FasL-függő sejtihalának szabályozásában.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk során a szelektív A_{2A} receptor agonista CGS21680 használatával az A_{2A} receptor aktiváció szerepét vizsgáltuk egér $CD4^+$ T-limfociták Th1 és Th2 alpopulációinak differenciálódásában és effektor funkcióinak szabályozásában, továbbá tanulmányoztuk fontosságát a T-sejtek aktiváció-indukált sejtihalának tekintetében. Emek során az alábbi kérdésekre kerestük a választ:

Az A_{2A} receptor aktiváció szerepe Th1 és Th2 polarizációs rendszerben

- Hogyan hat az A_{2A} receptor aktiváció *in vitro* Th1 illetve Th2 irányú polarizációnak kitett T-limfociták Th1, illetve Th2 típusú citokintermelésére?
- Hogyan hat az A_{2A} receptor aktiváció *in vitro* Th1 illetve Th2 irányú polarizációnak kitett T-limfociták proliferációjára?

Az A_{2A} receptor aktiváció szerepe Th1 és Th2 hibridómákon

- Hogyan hat az A_{2A} receptor aktiváció a már differenciáltnak tekinthető, effektor T-hibridómák Th1, illetve Th2 típusú citokintermelésére?
- Hogyan hat az A_{2A} receptor aktiváció a már differenciáltnak tekinthető, effektor T-hibridómák Th1, illetve Th2 citokin mRNS expressziójára?
- Milyen hatással van a Th1 illetve Th2 hibridómák TCR-en keresztüli aktivációjára az adenozin receptorok expressziójára?

Az A_{2A} receptor aktiváció szerepe a T-limfociták aktiváció-indukált sejthalálának szabályozásában

- Milyen hatással van az A_{2A} receptor aktiváció a T-limfociták életképességére?
- Hogyan hat az A_{2A} receptor aktiváció a T-limfociták aktiváció-indukált apoptózisára illetve az ehhez kapcsolódó jelátviteli utakra?

MÓDSZEREK

- Primer $CD4^+$ sejtek izolálása lépből MACS technikával
- Primer sejtek *in vitro* differenciálítása
- Immortalizált sejtvonalak előállítása hibridoma-technológiával
- Citokin koncentrációk mérése ELISA módszerrel
- A sejtek életképességének meghatározása MTT és LDH módszerrel
- Proliferációs és apoptózis vizsgálatok áramlási citométerrel
- mRNS expressziós szintek meghatározása real-time PCR segítségével
- SDS-PAGE és Western blot analízis
- Transzfelekció és a luciferáz aktivitás mérése

EREDMÉNYEK

Az A_{2A} receptor aktiváció szerepe Th1 és Th2 polarizációs rendszerben

Kísérleteink során az A_{2A} receptor aktiváció hatását vizsgáltuk a Th1 és Th2 sejtek fejlődésére és proliferációjára. Ehhez TCR stimuláció mellett Th1 vagy Th2 irányba polarizáló körülmények között *in vitro* differenciáltunk naiv egér $CD4^+$ T-sejteket, majd TCR-en keresztül újrasztulátuk őket. A sejtek proliferációjának és expanziójának vizsgálatára CFSE proliferációs vizsgálatot végeztünk. A vizsgálathoz WT illetve A_{2A} receptor KO egérből származó $CD4^+$ T-sejteket használtunk. Eredményeink alapján az A_{2A} receptor aktiváció erős gátló hatással van a Th1 és Th2 sejtek válaszképességére a korai fejlődési stádiumban.

- Az A_{2A} receptor aktiváció gátolja mind a Th1 irányba polarizált sejtek IFN- γ , mind a Th2 irányba polarizált sejtek IL-4, IL-5 és IL-10 termelését. A folyamat A_{2A} receptoron keresztül szabályozott, ugyanis szelektív A_{2A} receptor antagonistával miniké esetben helyreállítható az A_{2A} receptor agonista gátló hatása.
- Az A_{2A} receptor aktiváció a Th1 vagy Th2 polarizációs stimulustól függetlenül, az IL-2 termelés csökkentésén keresztül gátolja a naiv $CD4^+$ T-sejtek fejlődését és proliferációját. Ezt megerősíti, hogy az A_{2A} receptor KO egerekből származó T-sejtek esetén a fenti hatás nem tapasztalható.

Az A_{2A} receptor aktiváció szerepe Th1 és Th2 hibridómákon

Vizsgáljuk az adenozin hatását a már differenciáltnak tekinthető, effektor Th1 ill. Th2 sejtvonalak aktivációjára is. Ezekhez a vizsgálatainkhoz *in vivo* immunizációval, majd szomatikus sejtfúzióval nyert, Th1 vagy Th2 jellegzetességeket mutató egér T-hibridómákat használtunk. Eredményeink alapján az A_{2A} receptor aktiváció a korai fejlődési stádiumhoz hasonlóan erős gátló hatással van a Th1 és Th2 sejtek válaszkapességére a későbbi, effektor stádiumban is.

- A szelektív agonistával történő A_{2A} receptor aktiváció csökkenti az aktivált Th1 sejtek IFN- γ és kisebb mértékben az aktivált Th2 sejtek IL-4 termelését is. A szelektív A_{2A} receptor antagonistával mindkét esetben helyreállítható az A_{2A} receptor agonista gátló hatása.
- Az A_{2A} receptor aktiváció csökkenti mind az aktivált Th1 sejtek IFN- γ mRNS, mind az aktivált Th2 sejtek IL-4 mRNS expresszióját.
- TCR stimulációt követően minden adenozin receptor expressziója nő mind a Th1, mind a Th2 sejtek esetében, azonban az A_{2A} receptor mindkét esetben fokozottabb expressziót mutat a többihez képest.

Az A_{2A} receptor aktiváció szerepe a T-limfociták aktiváció-indukált sejtállalának szabályozásában

Jelen munkánk során kimutattuk, hogy az A_{2A} receptor aktiváció megvédi a CD4⁺ T-sejteket az aktiváció-indukált sejtállaltól (AICD). A ConA-aktivált T-limfociták apoptózisa FasL-függő AICD útján megy végbe, mivel a FasL neutralizálása során csak kis mértékben tapasztalható a sejtek apoptózisa.

- A szelektív agonistával történő A_{2A} receptor aktiváció segíti a T-limfociták túlélését és gátolja aktiváció-indukált apoptózisukat. A szelektív A_{2A} receptor antagonistával helyreállítható az A_{2A} receptor agonista anti-apoptotikus hatása.
- Az A_{2A} receptor aktiváció megvédi a T-limfocitákat az AICD-vel szemben. Az A_{2A} receptor aktiváció egyaránt csökkenti az apoptózis korai (foszfaidil-sterin külső plazmamembránra való áthelyeződése, Fas/FasL expresszió, kaszpáz-8 hasadása) és késői jeleit (kaspáz-3, PARP hasadása, NF- κ B, NF-AT, Egr transzkripció faktorok expressziója).
- Az A_{2A} receptor aktiváció T-sejeken megfigyelhető anti-apoptotikus hatásának szabályozója a PKA regulátoros alegysége. A cAMP másik lehetséges célpontja, az EPAC nem játszik szerepet a folyamatban.

KÖVETKEZTETÉSEK

Vizsgálatainkat megelőzően már ismert volt, hogy az A_2A receptorok döntő szerepet játszhattak a limfocita válaszreakciók szabályozásában. Az adenozin Th1 és Th2 sejtek fejlődésében, illetve effektor Th1 és Th2 sejtek aktivációjában betöltött pontos szerepe azonban még nem volt tisztázott. Eredményeink azt bizonyítják, hogy az A_2A receptor aktiváció erős gátló hatással van a T-limfociták aktivációjára mind a korai (differenciálódási), mind a későbbi (effektor) fejlődési szakaszban.

Vizsgálataink során továbbá azt tapasztaltuk, hogy az A_2A receptoron keresztüli aktiváció a Fas és a FasL expressziójának csökkentése révén gátolja a TCR-en keresztül stimulált $CD4^+$ T-limfociták aktiváció-indukált sejthalálát. Az A_2A receptorok általában az immunsejtek negatív regulátoraként ismertek, ugyanakkor az AICD olyan folyamat, ami az apoptózis révén gátat szabhat a T-limfociták túlzott immunreakciójának. Ez alapján nem zárható ki annak a lehetősége, hogy az A_2A receptorok aktivációja szupresszor funkciót betöltő T-sejt populációk fennmaradásával aktúdlisan akár fenn is tarthatja az immunválaszt.

Mindezek az eredmények alátámasztják, hogy az adenozin A_2A receptorokon keresztüli, T-sejt aktivációra és immunválaszra kifejtett hatása részleteiben még korántsem ismert, és a terápiás megoldások elősegítése érdekében további vizsgálatok elvégzése indokolt a témakörben.

Az értékezés témájában elfogadott közlemények:

1. **Leonóra Himer**, Balázs Csóka, Zsolt Selmecey, Balázs Koscsó, Tímea Pócza, Pál Pachter, Zoltán H. Németh, Edwin A. Deitch, E. Sylvester Vizi, Bruce N. Cronstein, György Haskó. *Adenosine A_2A receptor activation protects $CD4^+$ T-lymphocytes against activation-induced cell death*. FASEB J. 2010; 24(8): 2631-40. **IF: 6, 401** (2009)
2. Balázs Csóka, **Leonóra Himer**, Zsolt Selmecey, E. Sylvester Vizi, Pál Pachter, Catherine Ledent, Edwin A. Deitch, Zoltán Spolarics, Zoltán H. Németh, György Haskó. *Adenosine A_2A receptor activation inhibits T helper 1 and T helper 2 cell development and effector function*. FASEB J. 2008; 22(10): 3491-9. **IF: 7, 049**

Egyéb (nem az értékezés témájában) elfogadott közlemények:

1. Zoltán H. Németh, David Bleich, Balázs Csóka, Pál Pachter, Jon G. Mabley, **Leonóra Himer**, E. Sylvester Vizi, Edwin A. Deitch, Csaba Szabó, Bruce N. Cronstein, György Haskó. *Adenosine receptor activation ameliorates type 1 diabetes*. FASEB J. 2007; 21(10): 2379-88. **IF: 6, 791**
2. Balázs Csóka, Zoltán H. Németh, Peter Rosenberger, Holger K. Eltzschig, Zoltán Spolarics, Pál Pachter, Zsolt Selmecey, Balázs Koscsó, **Leonóra Himer**, E. Sylvester Vizi, Michael R. Blackburn, Edwin A. Deitch, György Haskó. *A_2B adenosine receptors protect against sepsis-induced mortality by dampening excessive inflammation*. J Immunol. 2010; 185(1): 542-50. **IF: 5, 646** (2009)

3. **Himer Leonóra**, Balog Attila, Szebeni Beáta, Nagy Szakál Dorottya, Sziksz Erna, Reusz György, Tulassay Tivadar, Vannay Ádám. *A Th17 sejtek szerepe rheumatoid arthritisben*. Orv Hetil. 2010; 151(25): 1003-10.
4. Nagy Szakál Dorottya, Szebeni Beáta, Sziksz Erna, **Himer Leonóra**, Reusz György, Vásárhelyi Barna, Tulassay Tivadar, Vannay Ádám. *Az epithelialis-mesenchymalis transzición jelenlőége vesefibrosisban*. Hypertonia és Nephrologia. 2011; 15(1): 29-34.
5. Sziksz Erna, Veres Gábor, Vannay Ádám, Prőkai Ágnes, **Himer Leonóra**, Ónody Anna, Korponay-Szabó Ilma Rita, Reusz György, Szabó András, Arató András, Szebeni Beáta. *Fokozott hősokk jelerje 72 expresszió gyermekkori coellaklában*. Gyermekgyógyászat. 2011; 62(1): 30-4.